Anàlisi d'ADN mitocondrial de cinc espècies de quiròpters de les Illes Balears

Blanca AMENGUAL, Marc LÓPEZ-ROIG, Oliver MAS, Javier GONZÁLEZ i Jordi SERRA-COBO

SHNB

SOCIETAT D'HISTÒRIA NATURAL DE LES BALEARS

Amengual, B., López-Roig, M., Mas, O., González, J. i Serra-Cobo, J. 2007. Anàlisi d'ADN mitocondrial de cinc espècies de quiròpters de les Illes Balears. *Boll. Soc. Hist. Nat. Balears,* 50: 269-277. ISSN 0212-260X. Palma de Mallorca.

S'ha analitzat l'ADN mitocondrial de *Myotis myotis*, *Myotis nattereri*, *Myotis capaccinii*, *Plecotus austriacus* i *Miniopterus schreibersii* per avaluar el grau de diferenciació genètica entre les poblacions de Balears i les continentals europees i determinar amb certesa les espècies. Els resultats confirmen la presència de *Myotis myotis* i mostren l'elevat grau de similitud genètica entre els individus de la mateixa espècie, ja fossin de Balears o del continent europeu. No s'ha observat la presència de *Myotis punicus* a Mallorca, espècie present a altres illes del Mediterrani. L'ADN dels *Myotis nattereri* de Mallorca s'apropa als *Myotis nattereri* de la península Ibèrica, actualment considerats *Myotis escalerai*. L'absència de diferències genètiques significatives entre les poblacions de *Miniopterus schreibersii* de Mallorca, Menorca i Catalunya són especialment interessants, ja que s'han observat diferències morfològiques significatives entre elles. Les esmentades diferències podrien ser degudes a factors ambientals, ja que hi ha intercanvi d'individus entre Mallorca i Menorca, i per tant existeix flux gènic entre les poblacions de les dues illes.
Paraules clau: *Illes Balears, quiròpters, ADN mitocondrial, Myotis myotis, Myotis escalerai, Myotis capaccinii, Plecotus austriacus, Miniopterus schreibersii.*

MITOCHONDRIAL DNA ANALYSIS OF FIVE SPECIES OF BATS FROM THE BALEARIC ISLANDS. The mitochondrial DNA of *Myotis myotis*, *Myotis nattereri*, *Myotis capaccinii*, *Plecotus austriacus*, and *Miniopterus schreibersii* have been analyzed to evaluate the degree of genetic differentiation between the Balearic and continental European populations and to determine their species with certainty. The results confirm the presence of *Myotis myotis* and show a high degree of genetic similarity between individuals of the same species, whether from the Balearic islands or the European continent. In Majorca no presence was observed of *Myotis punicus*, a species present in other Mediterranean islands. The DNA of the Majorcan *Myotis nattereri* is close to the of the *Myotis nattereri* of the Iberian peninsula, presently considered *Myotis escalerai*. The absence of significant genetic differences between the populations of *Miniopterus schreibersii* in Majorca, Menorca and Catalonia is especially interesting, as significant morphological differences have been observed between them. These differences may be due to environmental factors, since there is an exchange of individuals between Majorca and Menorca, therefore a gen flow exists between the populations of the two islands.
Keywords: *Balearic Islands, Chiroptera, mitochondrial DNA, Myotis myotis, Myotis escalerai, Myotis capaccinii, Plecotus austriacus, Miniopterus schreibersii.*

Blanca AMENGUAL, Marc LÓPEZ-ROIG i Jordi SERRA-COBO; Centre de Recerca d'Infeccions Víriques Illes Balears. Conselleria de Salut i Consum. Govern de les Illes Balears i Areambiental. E-mail: info@areambiental.com. Oliver MAS Areambiental. E-

mail: info@areambiental.com; Javier GONZÁLEZ, Unitat de Toxicologia Experimental i Ecotoxicologia. Parc Científic de Barcelona.

Recepció del manuscrit: 17-des-07; revisió acceptada: 31-des-07.

Introducció

Les tècniques moleculars d'anàlisis d'ADN són cada dia més utilitzades pels científics que realitzen estudis sistemàtics i filogenètics. Les esmentades tècniques han proporcionat una nova aproximació a la diversitat biològica i als processos evolutius. Les anàlisis d'ADN mostren la diferenciació genètica d'espècies difícilment identificables morfològicament. Les anàlisis moleculars permeten observar processos d'especiació en fases inicials quan encara les diferències morfològiques són mínimes, però també permeten diferenciar espècies que han seguit processos evolutius convergents en els que s'han seleccionat morfologies molt similars. Un bon exemple de convergència evolutiva ha estat mostrat per Stadelmann *et al.* (2007) en les espècies del gènere *Myotis* americanes i europees. Aquests darrers anys s'han descrit, a Europa, diverses espècies críptiques de ratapinyades, com per exemple *Pipistrellus pygmaeus*, *Myotis alcathoe* i *Myotis escalerai* espècies bessones de *Pipistrellus pipistrellus*, *Myotis mystacinus* i *Myotis nattereri*, respectivament (Ibáñez *et al.*, 2006). L'interès en la determinació d'una espècie va més enllà del valor estrictament taxonòmic. Així per exemple, conèixer amb certesa una espècie té gran importància en estudis epidemiològics en els que s'ha de determinar quin és l'hoste d'un agent patogen.

Les poblacions insulars i continentals d'una mateixa espècie presenten major o menor grau de diferenciació genètica en funció, entre d'altres factors, del grau i temps d'aïllament que hi ha hagut entre elles. Tenint present la relativa elevada diversitat genètica de les ratapinyades europees, el caràcter insular de les Balears i els estudis sobre *Lyssavirus* que s'estan realitzant (Serra-Cobo *et al.*, 2002; Amengual *et al.*, 2007a), s'ha analitzat l'ADN d'algunes espècies de quiròpters per avaluar el grau de diferenciació genètica i determinar amb certesa les espècies.

Material i mètodes

Espècies i localitats analitzades

S'ha analitzat ADN mitocondrial de cinc espècies de ratapinyades de les Illes Balears. De la família dels Vespertiliònids han estat estudiats quatre *Myotis myotis* (ratapinyada de morro llarg), tres *Myotis nattereri* (ratapinyada de Natterer), un *Myotis capaccinii* (ratapinyada de peus grans) i un *Plecotus austriacus* (ratapinyada orelluda meridional) (Figs. 1-4), totes elles capturades a Mallorca. De la família dels Miniopterids, *Miniopterus schreibersii* (ratapinyada de cova) (Fig. 5), s'han analitzat quatre individus procedents de Mallorca, dos de Menorca i tres de Catalunya (Serra-Cobo *et al.*, 2006; 2007).

Extracció d'ADN

El material biològic analitzat correspon a petites mostres de patagi d'individus capturats. L'extracció d'ADN s'ha realitzat seguint el protocol de QIAGEN.

Amplificació, seqüenciació i alineament

A partir del material genètic extret, s'ha amplificat per *polymerasa chain reaction* (PCR) el gen mitocondrial del citocrom b



Fig. 1. Exemplar de *Myotis myotis* procedent d'una colònia mallorquina (fotografia de Blanca Amengual).
Fig. 1. *An example of* Myotis myotis *from a Majorcan colony (photo by Blanca Amengual).*



Fig. 2. La fotografia mostra un *Myotis escalerai* procedent d'una colònia de Mallorca (fotografia cedida per Xavier Bayer).
Fig. 2. *This photo shows a* Myotis escalerai *from a colony in Majorca (photo courtesy of Xavier Bayer).*



Fig. 3. *Myotis capaccinii* és una espècie força abundant a Mallorca i a Menorca (fotografia de Marc López-Roig).
Fig. 3. Myotis capaccinii *is an abundant species in Majorca and Menorca (photo by Marc López-Roig).*

(Bickham *et al.*, 2004) en el cas dels Vespertiliònids. Pel que fa als Miniopterids s'ha analitzat el gen mitocondrial $NADH_2$ (Appleton *et al.*, 2004). Els gens seqüenciats han estat alineats, juntament amb seqüències del GenBank (Appleton *et al.*, 2004; Ibáñez *et al.*, 2006; Ruedi i Mayer, 2001; Stadelmann *et al.*, 2007), amb el programa BioEdit (Hall, 1999). Els arbres han estat elaborats amb el programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). L'arbre dels Vespertiliònids ha estat elaborat amb seqüències de 680 parells de bases i el de Miniopterus s'ha confeccionat amb seqüències de 1037 parells de bases.

Resultats

L'ADN dels gens seqüenciats procedents dels *Myotis myotis*, *Myotis capaccinii, Plecotus austriacus* i *Miniopterus schreibersii* de Balears s'agrupa amb l'ADN de les mateixes espècies però de poblacions continentals (Figs. 6-7). En canvi, l'ADN dels *Myotis nattereri* mallorquins no s'agrupa amb l'individu de Grècia i s'apropa als *Myotis nattereri* de la península Ibèrica, actualment considerats *Myotis escalerai* (Ibáñez *et al.*, 2006).

No s'ha observat la presència de *Myotis punicus* a Mallorca, espècie present al nord d'Àfrica i a les illes de Sardenya, Còrsega i Malta (Dietz i Von Helversen, 2004) (Fig. 6).



Fig. 4. *Plecotus austriacus* és una ratapinyada present a totes les Illes Balears (fotografia de Blanca Amengual).
Fig. 4. Plecotus austriacus *is a type of bat present in all the Balearic Islands (photo by Blanca Amengual).*

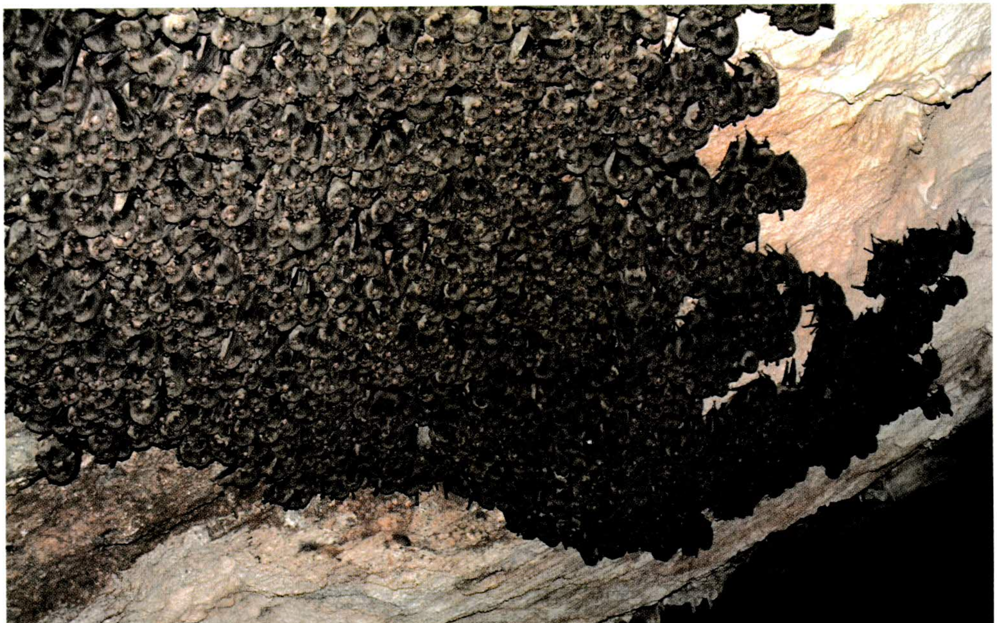


Fig. 5. *Miniopterus schreibersii* és una espècie migradora regional (fotografia de Marc López-Roig).
Fig. 5. Miniopterus schreibersii is a regional migratory species (photo by Marc López-Roig).

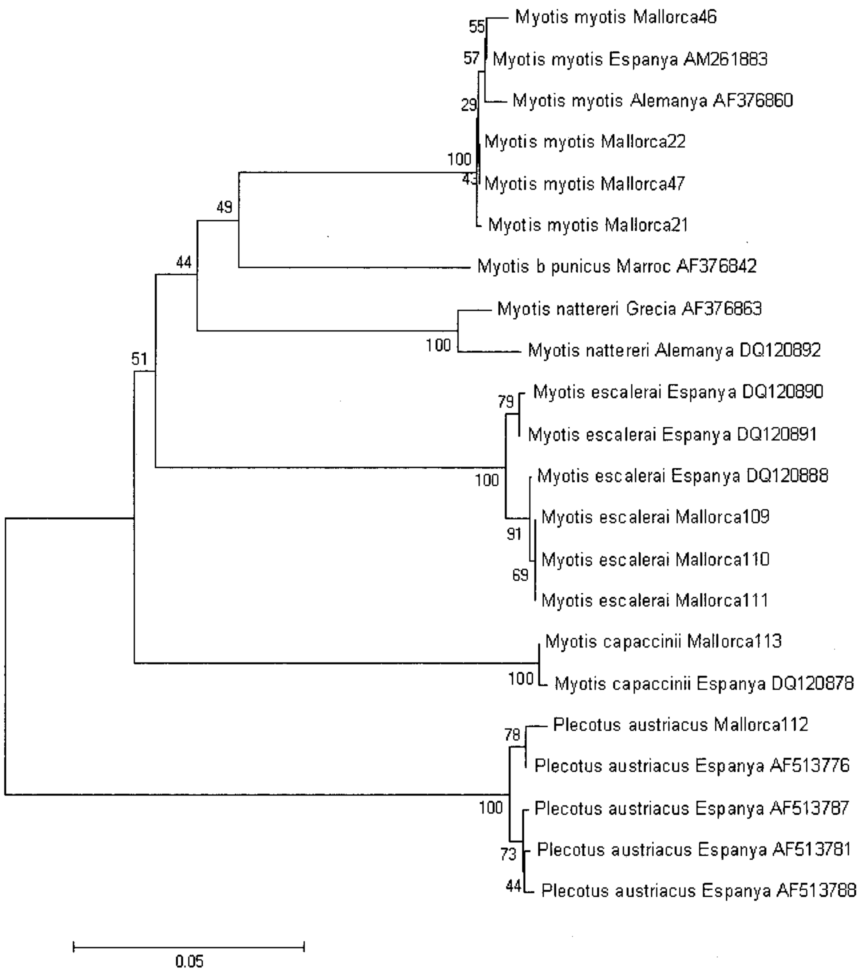


Fig. 6. Relacions filogenètiques entre seqüències parcials del gen mitocondrial citocrom b (680 bp) obtingudes per Neighbor-Joining (NJ) utilitzant MEGA (versió 4). Les seqüències obtingudes durant aquest estudi han estat comparades amb altres seqüències d'espècies de la família Vespertilionidae (Ibáñez *et al.*, 2006; Juste *et al.*, 2004; Ruedi *et al.*, 2001; Stadelmann *et al.*, 2007). Els valors de bootstrap (10.000 rèpliques) s'indiquen en els principals nòduls.

Fig. 6. *Phylogenetic relationships between partial mitochondrial cytochrome b gene (680 bp) obtained by Neighbor-Joining (NJ) using MEGA version 4. Sequences obtained during this study were compared with sequences of different bat species belonging to family Vespertilionidae (Ibáñez* et al., *2006; Juste* et al., *2004; Ruedi* et al., *2001; Stadelmann* et al., *2007). Bootstrap values (10,000 replications) are indicated for the principal nodes.*

Discussió

Les dades obtingudes mostren l'elevat grau de similitud genètica (dels gens citocrom b i $NADH_2$) existent entre els individus de la mateixa espècie que han estat analitzats, ja fossin de Balears o del continent europeu.

El present treball també permet confirmar la presència de *Myotis escalerai* a Mallorca. Aquesta espècie fins fa poc temps se la considerava i anomenava ratapinyada

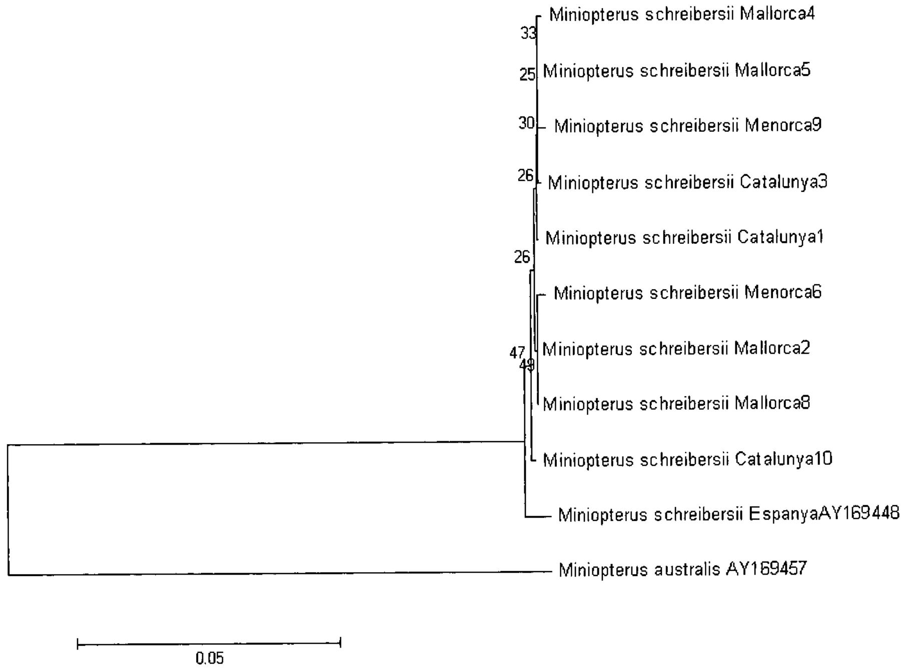


Fig. 7. Relacions filogenètiques entre seqüències del gen mitocondrial NADH2 (1037bp) obtingudes per Neighbor-Joining (NJ) utilitzant MEGA (versió 4). Les seqüències obtingudes durant aquest estudi han estat comparades amb altres seqüències de *Miniopterus* (Appleton et al., 2004). Els valors de bootstrap (10.000 rèpliques) s'indiquen en els principals nòduls.

Fig. 7. *Phylogenetic relationships between the entire mitochondrial NADH2 gene (1037 bp) obtained by Neighbor-Joining (NJ) using MEGA version 4. Sequences obtained during this study were compared with sequences of two* Miniopterus *species (Appleton et al., 2004). Bootstrap values (10,000 replications) are indicated for the principal*

de Natterer, *Myotis nattereri*. Ha estat a partir dels estudis moleculars realitzats per Ibáñez *et al.* (2006) que s'han pogut diferenciar clarament una i altra espècies. Tanmateix, ja al 1904 el científic Àngel Cabrera va trobar petites diferències entre les ratapinyades que hom considerava *Myotis nattereri*. Les seves observacions i estudis el van portar a proposar la diferenciació en dues espècies, que després d'aprofundir en els estudis morfològics ell mateix va descartar. Cabrera va examinar exemplars de la Península i va observar que el patagi s'inseria al turmell. Pel contrari, les descripcions dels exemplars europeus indicaven que el patagi s'inseria en la base dels dits del peu. Per això va arribar a parlar d'una espècie diferent que va anomenar *Myotis escalerai*. Tornant als estudis realitzats els darrers anys, s'ha comprovat que efectivament hi ha diferenciació genètica entre aquestes dues espècies. *Myotis escalerai* es distribueix a bona part de la península Ibèrica (Ibañez *et al.*, 2006), mentre que *Myotis nattereri* es distribueix a bona part de la resta d'Europa. La confirmació de *Myotis escalerai* a Mallorca és interessant des d'un punt de vista epidemiològic ja que en estudis anteriors s'havia isolat *Lyssavirus* (EBLV-1) a *Myotis nattereri* mallorquins (Serra-Cobo *et al.*, 2002). Les anàlisis d'ADN d'individus de la colònia infectada

per *Lyssavirus* mostren que en realitat es tracta de *Myotis escalerai*. Així doncs, és la primera citació que es coneix de *Myotis escalerai* infectat per EBLV-1.

La presència de *Myotis punicus* a les illes de Sardenya, Còrsega, Malta i al nord d'Àfrica, espècie relativament similar a *Myotis myotis*, va aconsellar analitzar l'ADN d'alguns individus de les colònies de *Myotis myotis* de les Illes Balears. Els resultats de les anàlisis genètiques confirmen la presència de *Myotis myotis* a Mallorca, dades especialment importants en els estudis de la dinàmica de *Lyssavirus* que es realitzen a Balears (Amengual *et al.*, 2007a).

L'absència de diferències genètiques significatives entre les poblacions de *Miniopterus schreibersii* de Mallorca, Menorca i Catalunya (Fig. 7) són especialment interessants, ja que s'han observat diferències morfològiques significatives entre elles (resultats inèdits). Les ratapinyades de la població menorquina són més petites que els individus de la resta de poblacions estudiades. Les variacions de mida podrien ser degudes a factors ambientals, ja que hi ha intercanvi d'individus entre Mallorca i Menorca, i per tant existeix flux gènic entre les poblacions de les dues illes (Amengual *et al.*, 2007b). *Miniopterus schreibersii* és una espècie migradora regional capaç de realitzar vols relativament ràpids. Sí bé la majoria de desplaçaments estacionals són de poc més de 100 Km de recorregut, també és cert que s'ha comprovat alguns desplaçaments de llarga distància. Així per exemple, el major recorregut d'una ratapinyada de cova del qual se'n té constància és de 833 km (comentari de Benzal in Hutterer *et al.*, 2005). A Catalunya el major desplaçament comprovat ha estat de 270 km i a Balears de poc més de 100 km (Serra-Cobo i Balcells, 1991; Serra-Cobo *et al.*, 1998; Amengual *et al.*, 2007b).

La similitud genètica observada en l'estudi entre les mateixes espècies però de poblacions de Balears i poblacions de la Península podria ser deguda, en major o menor mesura, a un aïllament recent de les poblacions o a l'existència d'un cert flux gènic entre les poblacions insulars i les peninsulars.

Agraïments

Els autors del present estudi agraeixen el suport econòmic i logístic proporcionat per la Conselleria de Medi Ambient i la Conselleria de Salut i Consum del Govern de les Illes Balears. Agrair la col·laboració de Xavier Bayer, Cisco Guasch i Josep Màrquez en els treballs de prospecció.

Bibliografia

Amengual, B., Bourhy, H., López-Roig, M. i Serra-Cobo, J. 2007a. Temporal dynamics of European Bat Lyssavirus type 1 and survival of *Myotis myotis* bats in natural colonies. PLoS ONE, June, Issue 6, e566.

Amengual, B., López-Roig, M. i Serra-Cobo, J. 2007b. First record of seasonal over sea migration of *Miniopterus schreibersii* and *Myotis capaccinii* between Balearic Islands (Spain). *Acta Chiropterologica*, 3: 319-322.

Appleton, B.R., McKenzie, J.A. i Christidis, L. 2004. Molecular systematics and biogeography of the bent-wing bat complex *Miniopterus schreibersii* (Kuhl, 1817) (Chiroptera: Vespertilionidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31 (2): 431-439.

Bickham, J.W., Patton, J.C., Schlitter, D.A., Rautenbach, I.L. i Honeycutt, R.L. 2004. Molecular phylogenetics, karyotypic diversity, and partition of genus *Myotis* (*Chiroptera: Vespertilionidae*). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 33: 333-338.

Dietz, C. i Von Helversen, O. 2004. Illustrated identification key to the bats of Europe. Electronic publication.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.,* 41: 95-98.

Hutterer, R., Ivanova, T., Meyer-Cords, C. i Rodrigues, L. 2005. Bat migrations in Europe. A review of banding data and literature. Federal Agency for Nature Conservation., Bonn, 162 pp.

Ibáñez, C., García-Mudarra, JL., Ruedi, M., Stadelmann, B. i Juste, J. 2006. The Iberian contribution to cryptic diversity in European bats. *Acta Chiropterologica,* 82(2): 277-297.

Juste, J., Ibáñez, C., Muñoz, D., Trujillo, P., Benda, P., Karata, S. i Ruedi, M., 2004. Mitochondrial phylogeography of the long-eared bats (Plecotus) in the Mediterranean Palaearctic and Atlantic Islands. Molecular Phylogenetics and Evolution, 31(3): 1114-1126.

Ruedi, M. i Mayer, F. 2001. Molecular systematics of bats of the genus *Myotis* (*Vespertilionidae*) suggests deterministic ecomorphological convergences. Mol Phylogenet Evol., 21(3): 436-448.

Serra-Cobo, J. i Balcells, E., 1991. Migraciones de quirópteros en España. *In*: Los murciélagos de España y Portugal. Benzal, J. et Paz, O. de (Eds.). Monografías del ICONA, Colección Técnica, 181-209, Madrid.

Serra-Cobo, J., Sanz, V. i Martínez-Rica, J.P. 1998. Migratory movements of *Miniopterus schreibersii* in the north-east of Spain. *Acta Theriologica*, 43(3): 271-283.

Serra-Cobo, J., Amengual, B., Abellán, C., Bourhy, H. 2002. European Bat *Lyssavirus* Infection in Spanish Bat Populations. *Emerg Infect Dis.*, 4: 413-420.

Serra-Cobo, J., Amengual, B., López-Roig, M., Márquez, J., Torres, M., Ripoll, A., Sánchez, A. i Oliver, J.A. 2006. Catorze anys d'estudis quiropterològics a les Illes Balears (1993-2006). *Boll. Soc. Nat. Balears,* 49: 89-107.

Serra-Cobo, J., Amengual, B., López-Roig, M., Márquez, J., Torres, M., Ripoll, A., Sánchez, A. i Oliver, J.A. 2007. Quinze anys d'estudis quiropterològics a les Illes Balears (1993-2007). *Endins*, 31: 125-140.

Stadelmann, B., Lin, L.-K., Kunz, T.H. i Ruedi, M. 2007. Molecular phylogeny of New World *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA genes. *Mol Phylogenet Evol,* 43: 32-48.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. i Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.,* 24(8):1596-1599.